

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/40, 7/04, 5/06, A61K 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/09700 (43) 国際公開日 2000年2月24日(24.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04333		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(22) 国際出願日 1999年8月10日(10.08.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/227398	JP	1998年8月11日(11.08.98)
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)		
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 浅川 誠(ASAKAWA, Makoto)(JP/JP) 〒561-0825 大阪府豊中市二葉町3丁目2番1号 シオノギ神崎川寮319号室 Osaka, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
長谷川謙(HASEGAWA, Mamoru)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		
(54) Title: RNA VIRUS VECTOR HAVING CONTACT INFILTRATION CAPABILITY		
(54)発明の名称 接触浸潤力を有するRNAウイルスベクター		
(57) Abstract An RNA virus vector useful in gene therapy. This RNA virus vector has capabilities of infecting cells, autonomously replicating RNA and contact infiltrating but no communicability. Use of this RNA virus vector makes it possible to more efficiently perform gene transfer and cell transplantation in gene therapy than in the conventional cases.		
<p>... CELL INFECTED WITH WILD TYPE VIRUS ... UNINFECTED CELL ... CELL INFECTED WITH M-DELETION VIRUS</p>		

本発明は、遺伝子治療に有用なRNAウイルスベクターを提供する。本発明のRNAウイルスベクターは、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが、伝播力を有さない。本発明のRNAウイルスベクターを利用することにより、遺伝子治療を行う際に、従来よりも効率的に遺伝子導入及び細胞移植を行うことが可能となった。

## PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	L1 リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AZ オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
BH アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レンドネー	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GG グルジア	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE ジーナ	LV ラトヴィア	SZ スワジ蘭ド
BP ブルギリア ファソ	GM ガンビア	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GN ギニア	MC モナコ	TG トーゴー
BJ ベナン	GW ギニア・ビサオ	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GY ギリシャ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	HR クロアチア	MK マケドニア(旧ユーゴスラヴィア)	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HL ヘンガリー	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	ID インドネシア	MN モンゴル	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴ	IE アイルランド	MR モリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IL イスラエル	MW ミャンマー	US 本国
CI コートジボワール	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CN 中国	JP 日本	NL オランダ	YL ニューゴースラビア
CR コスタ・リカ	KE ケニア	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	KO キルギスタン	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KR 北朝鮮	PL ポーランド	
CZ チェコ	KR 韓国	PT ポルトガル	
DE ドイツ		RO ルーマニア	
DK デンマーク			

## 明細書

### 接触浸潤力を有するRNAウイルスペクター

#### 技術分野

本発明は、遺伝子治療に利用できるウイルスペクターに関する。詳しくは、本発明は不活化された（-）鎖RNAウイルスペクターに関する。

#### 背景技術

ヒトや動物に対する遺伝子治療において、治療効果と安全性は極めて重要な課題である。特に、ウイルスの遺伝子を組換えることにより得られる「ウイルスペクター」を用いて行われる治療は、たとえ治療効果が認められる場合でも、遺伝子が染色体DNAの不特定な位置に挿入されたり、組換え体ウイルスや病原性ウイルスが自然界に放出されたり、細胞内に導入された遺伝子発現の制御ができない等の可能性を否定できない場合には、治療行為を極めて慎重に行う必要がある。

ウイルスペクターは、ウイルスの感染能を利用して目的遺伝子を標的細胞内に導入するために主に用いられる。ウイルス遺伝子に目的遺伝子を挿入する等の遺伝子操作を施した組換え型ウイルスペクターの表面には、ウイルス由来のエンベロープ蛋白質等が存在しており、それが由来するウイルスの感染能を保有しているので、その内部の組換え遺伝子を細胞内に導入することが可能となる。このような組換え型ウイルスペクターは、遺伝子治療のみならず、目的遺伝子発現細胞の作製、トランスジェニック動物作製等に使用することが可能である。

ウイルスペクターは、レトロウイルスペクター、DNAウイルスペクター、RNAウイルスペクターの3者に分類されるが、染色体に挿入されることがないという安全性の面でRNAウイルスペクターは有利である。このような技術背景からすでにセンダイウイルス等の非分節型（-）鎖RNAウイルス由来のウイルスペクターが

提供されている(D.Yuら,Genes To Cells,2:457-466,1997, M.Hasanら,J.Gen.Virology, 78:2813-2820,1997)。本発明者らは、伝播力を有さないが感染力とRNAの自律複製能を有する（-）鎖RNAウイルスベクターをすでに開発している（国際公開97/16538号参照）。

#### 発明の開示

本発明は、遺伝子治療に利用できるRNAウイルスベクターを提供することを課題とする。

本発明者らはまず、（-）鎖RNAウイルスの代表格であり、安全性や利便性の点からベクターとして産業上最も有用であると考えられるセンダイウイルス核酸を用いて種々の欠損型変異体を取得し、これらの欠損型変異体を公知の手法によりウイルス再構成試験に供した。すると、M遺伝子に障害を有する変異体に由来する再構成複合体が、野生株よりも小さなブラークを形成する能力があるが、鶏卵中で増殖しないことを見いだし、該変異株は、細胞感染能、RNA自律複製能及び接触浸潤力を有するが伝播力を有さないことを確認した。さらに、M遺伝子に障害を有する欠損型変異体に由来するブラークは、抗センダイウイルス抗体では染色されるが、抗Mモノクローナル抗体では染色されなかったことから、該M変異株は、完全なMタンパク質を欠くブラークであることを確認し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、接触浸潤力及びRNA自律複製能に関わる遺伝子群を有するが伝播力に関わる遺伝子群が欠失または不活性化されているRNAを提供する。

本発明は、また、上記のRNAを含有し、該RNAを複製しつつ接触浸潤により該RNAを別の細胞に伝達することができる細胞を提供する。

本発明は、さらに、該RNAを発現させることにより形成される細胞感染能、接触浸潤力及びRNA自律複製能を有するが伝播力を有さない複合体、その製造方法及び該複合体を製造するためキットを提供する。

また、本発明は、上記のRNAを試験管内または細胞内で転写することのできる錆

型DNAを含むDNAを提供する。

本明細書において、ウイルスベクターの「細胞感染能」とは、「ウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能等を保持していることにより、細胞内にウイルス内部の核酸等を導入することのできる能力」を意味する。「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染性粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」を意味する。また、「接触浸潤力」とは、「ウイルスベクター遺伝子を保持する細胞が別の細胞と接触することによりその遺伝子をその細胞に伝達することのできる能力」を意味する。

伝播力を有さないが、接触浸潤力を有するウイルスをベクターとして用いたときに、既存の、伝播力及び接触浸潤力を有さないウイルスベクターの持つ致命的な欠点を補うことができる。すなわち、ウイルスベクターを細胞に感染させてウイルスベクターが担持する遺伝子を発現させる場合、既存のベクターでは、直接的にウイルスベクターが感染した細胞でしか発現させることができない。細胞が一層に並び、すべての細胞に直接的にウイルスベクターを感染させることのできる培養細胞系では問題にならないが、細胞が立体的に多層的に存在する生体内に直接感染させることを考えた場合、ウイルスベクターを直接感染させることのできる部位、あるいは細胞数は限られている。たとえば腫瘍部位にウイルスベクターを直接感染させた場合、腫瘍を形成する細胞すべてに感染させることは非常に困難である。

これに対して、接触浸潤力を有するウイルスベクターを腫瘍部位に感染させた場合、直接的には一部の細胞にしか感染しなくとも、感染細胞に隣接した細胞に接触浸潤力を介して感染するので、結果的にすべての腫瘍細胞を感染させることができる。また、このウイルスベクターは、伝播力を有さないので、血流に乗つて他の部位の細胞が感染する可能性はない。

すなわち、このウイルスベクターを遺伝子治療に用いた場合、特定の臓器、特

定の部分に限りすべての細胞に感染し、なおかつ他の部位に感染するおそれのないという新しい特徴を持ったウイルスベクターである。

また、本発明の細胞感染能、RNA自律複製能及び接触侵潤力を有するが伝播力を有さないウイルスベクターを保持する細胞は、細胞移植用の細胞として利用することができる。すなわち、自律複製能を有するベクターを持つ細胞が接触侵潤力によって、内部のベクターを他の細胞に侵入させることができるので、ウイルスベクターを保持する細胞を治療を要する部位に必要量だけ移植することにより、その部位を治療することが可能となる。

なお、M遺伝子が欠損した麻疹ウイルス(Measles virus)は、感染性粒子の形成が阻害され、細胞融合が促進されることが報告されている(T. Cathomenら, EMBO J., 1998, 17: 3899-3908)が、このウイルスをベクターとして使用する可能性については全く示唆されていない。

本発明の(-)鎖RNAウイルスの材料となるウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンバーウイルス(distemper virus)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(流感 virus)、ラブドウイルス科(rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular S)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。DI粒子(J. Virol. 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、材料として使用することができる。

材料となる(-)鎖RNAウイルスとしては、上記のいずれかのウイルスに由来する組換え体(-)鎖RNAウイルスを用いてもよい。組換え体(-)鎖RNAウイルスは、たとえば免疫原性に関する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでもよい。

本発明のRNAは、前記のいずれかのウイルスまたは組換え体ウイルスのcDNAを改変したものを試験管内または細胞内で転写することにより得ることができる。このとき得られるRNAは、由来するウイルスの伝播力に関わる少なくとも1つの遺伝子が欠失または不活性化していることが必要であるが、自律複製および接触浸潤力に関わる遺伝子が欠失または不活性化してはならない。また、DI分子など、ウイルスゲノムの両端構造を持つcDNAに、人工的に自律複製に関わる遺伝子群を挿入したDNAを試験管内または細胞内で転写することにより得られる人工的な配列を持つRNA分子も、同様に用いることが可能である。

センダイウイルスの場合は、「自律複製に関わる遺伝子」とは、NP、P/C、Lのいずれかの遺伝子であり、「伝播力に関わる遺伝子」とは、M、F、HNのいずれかの遺伝子である。また、M遺伝子のみを欠失または不活性化させた場合、細胞外にゲノム由来RNAを含む複合体を放出する能力を持つウイルス粒子またはウイルス様粒子が形成されないため、ウイルスの「伝播力」は消失するが、「接触浸潤力」は残存する。したがって、例えばM遺伝子のみを欠失させたセンダイウイルスZ株のRNA及び該RNAを含むリボ核タンパク質(RNP)を本発明において好適に用いることができる。ただし、これらの遺伝子群はウイルス由来の配列そのままでなくとも、転写、複製における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいはほかのウイルスの相当遺伝子で代用してもよい。

本発明のRNAは、適当な部位に外来性遺伝子が挿入されたものでもよい。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNA(ジェンバンクアクセッション番号M30202)においては、R1配列とR2配列との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい(Journal of Virology, Vol.67, No.8, (1993)p.4822-4830)。R1配列およびR2配列のコンセンサス配列はそれぞれ(5'-AGGGWBAAWGD-3')および(5'-DTAAGAAAAA-3')である。挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルス

RNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。

本発明の複合体は、上記RNAと核酸を含まないウイルス構造体を含む。「核酸を含まないウイルス構造体」とは、例えばウイルスからRNAだけ除去したものであつて、本発明のRNAの感染能と自律複製能は相補するが、細胞外に複合体を放出し、自由に運動する粒子を形成することを相補しない、すなわち伝播力は相補しないものが用いられる。センダイウイルスの場合、M遺伝子のみを欠損または消失させたセンダイウイルスのRNAと、センダイウイルスからRNAとM蛋白質を除去したウイルス構造体とからなる複合体(RNP)は、感染能と自律複製能を有するが伝播力は有さない複合体である。複合体は、伝播力がないものであれば、これら以外のものを含んでいても構わない。例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。

また、本発明は、a)上記の本発明のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを合成しうるユニット、及びb)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を合成しうるユニット、を含むキットに関する。適当な宿主内に、上記a)及びb)のユニットを導入することによって本発明の細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を製造することができる。本発明の複合体を製造するということは、自律複製するRNPを再構成することを意味する。上記a)のユニットにおいて、センダイウイルス由来のRNAを用いる場合、b)のユニットとしては、センダイウイルスのNP、P/C及びL蛋白質のすべて、または該蛋白質群を合成しうるユニットが好ましい。

宿主としては、用いるウイルスRNAが発現しうる細胞であれば、特に限定されない。センダイウイルス由来のRNAを用いる場合は、センダイウイルスが感染できる細胞、例えば、培養された哺乳動物または鳥類細胞や鶏卵などが挙げられる。培養細胞としては、LLCMK2、MDCK、MDBK、CV-1、Hela、HepG2、P19、F9、CHO、PC12、293細胞、BAF3、Jerkat、ヒトPBMC、MT-4、Molt-4、NIH3T3、L929、ニワトリ

胚繊維芽細胞等を用いることができる。

センダイウイルスの効率良い粒子再構成のためには、細胞内に導入するcDNAの形態が線状よりも環状のほうが良く、また（-）鎖RNAが細胞内で転写されるよりも、（+）鎖RNAが細胞内で転写されるほうが粒子形成効率が高いことが、本発明者によって確認されている(A.Katoら, Genes To Cells, 1:569-579, 1996)。これら条件が他のすべての（-）鎖RNAのウイルス再構成に適用できるとは限らないが、他の（-）鎖RNAウイルス再構成に際しても、本明細書の記載内容および技術常識に基づいて適宜条件を検索することは可能である。

生産された複合体は、宿主、例えば、培養細胞や鶏卵から、常法によって回収しうる。

複合体に含まれるRNAにコードされた外来遺伝子は、この複合体を細胞に感染させることにより発現させることができる。例えば、鶏卵または動物生体内の組織に接種する、もしくは、複合体を保持する細胞を接種することによりその組織内で外来遺伝子を発現させることができる。体内から取り出した細胞を、複合体を細胞内に自律複製している細胞に変換し、体内に戻し、その細胞が接触した細胞に外来遺伝子を発現させることも可能である。

なお、本発明の一態様としての、M遺伝子が欠失または不活性化したセンダイウイルスの複合体が標的細胞へ感染後、接触浸潤により周辺の非感染細胞に本発明に含まれるRNAが浸潤する過程を、図9として例示する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、プラスミドpUC18/T7(+)HVJ<sub>Rz</sub>の構成を示す図である。

図2は、センダイウイルスcDNAにおけるM遺伝子領域、および該領域をサブクローン化または変異するためのスキームを示す図である。図中、Eは転写終結配列、Iは介在配列、Sは転写開始配列を表す。プラスミドの構築に用いた制限酵素位置を枠で囲んで表す。

図3は、センダイウイルスcDNAにおけるM遺伝子領域に変異処理を施すスキームを示す図である。Aの上段はセンダイウイルスゲノムの構造を表し、NP、P(P/C)、M、F、HN、Lの各遺伝子の配置を示した。下段はM遺伝子の構造と制限酵素位置、およびM遺伝子の欠損型を構築する際に用いたM1およびM2プライマーの位置を表す。B、CはM遺伝子欠損型および欠失型の構築スキームを表す。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。DはM遺伝子欠損型と野生型M遺伝子との塩基配列およびアミノ酸配列の比較を表す。図中ドットは、野生型と配列が同一であることを表す。「Ter」は終結コドンを表す。数字はM遺伝子における位置を表す。

図4は、センダイウイルスcDNAにおけるM遺伝子領域をサブクローン化するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

図5は、サブクローン化したセンダイウイルスM遺伝子領域に変異処理を施し、全長のセンダイウイルスcDNAのM遺伝子領域と置換することによりM欠失型cDNAを構築するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

図6は、サブクローン化したセンダイウイルスM遺伝子領域に変異処理を施し、全長のセンダイウイルスcDNAのM遺伝子領域と置換することによりM欠損型cDNAを構築するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

図7は、野生型M遺伝子(WT1およびWT2)、M遺伝子欠損型(dM)、およびM遺伝子欠失型(dMEA2-1およびdMEA2-2)のセンダイウイルスcDNAに由来するブラークを示す図である。

図8は、抗センダイウイルス抗体で染色した野生型M遺伝子(WT)、M遺伝子欠損型(dM)、およびM遺伝子欠失型(dMEA)のセンダイウイルスcDNAに由来するブラークを示す図である。

図9は、M遺伝子に変異が生じたセンダイウイルスゲノムの接触浸潤様式を示す模式図である。上段は野生型センダイウイルスゲノムの場合を表し、感染性粒子が形成され、接触浸潤も起こる。下段のM遺伝子に変異が生じたセンダイウイルスゲノムは、感染性粒子を形成する能力を欠き、接触浸潤のみによりゲノムが周囲の細胞へ導入される。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### **[実施例 1] センダイウイルス由来M遺伝子のサブクローニング**

以下に実施するすべてのライゲーション反応、末端平滑化反応および脱リン酸化処理にはTakara Ligation Kit Ver.2（宝酒造社、京都）、Takara Blunting Kit（宝酒造社）およびCIAP（宝酒造社）をそれぞれ用い、製品のプロトコルに従うことにより行なった。また、塩基配列の決定には、サンガー法(F. Sanger, Science, 214:1205-1210, 1981)を用いた。

野生型cDNAである pUC18/T7(+)HVJRz(A. Katoら, Genes To Cells, 1:569-579, 1996)（図1）を出発材料として、以下の段階を経てM遺伝子を欠失したcDNAを構築した。M遺伝子とその近傍のDNA塩基配列を図2に、構築の概念図を図3にそれぞれ示した。

まず、M遺伝子を含むClaI断片をpUC18/T7(+)HVJRzより回収し、pHSG396（宝酒造社）のClaIサイトに挿入することによりpHSG-M-CC（図4）を得た。一方、pHSG396をApaLIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることによりApaLI部位を欠失させたpHSG396-dA（図4）を作製した。pHSG-M-CCのM遺伝子を含むEcoRI- BamHI断片を、pHSG396-dAをEcoRIおよびBamHIで切断処理後脱リン酸化処理を行なったものに挿入することにより、pHSG-dA-M-BE（図4）を得た。

##### **[実施例 2] M欠失型ベクターの作製**

49merの合成オリゴヌクレオチド5'-ggcgatatctatagattccctaagttctcatagtagatgtgcaccggca-3' (EAリンカーF) (配列番号: 1) および5'-tgcccggtgcacatctactatgagaacttaggaatctatagatatcgcc-3' (EAリンカーR) (配列番号: 2) を合成し、アニール処理後pCR2.1(インビトロジェン社)に挿入することによりpCR-EALを作製した。また、挿入断片の塩基配列が設計どおりであることを確認した。

pCR-EALをEcoRVおよびApaLIで切断し、リンカー断片を切り出した。一方、pHS G-dA-M-BEをEcoRVおよびApaLIで切断したものに上記リンカーを挿入することにより、pHSG-dA-dM-EA-EBを得た。

pHSG396をEcoRIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることにより得られたEcoRI部位を欠失したプラスミドをさらにBamHIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることによりEcoRIおよびBamHIの両切断部位を欠失したプラスミドpHSG-dE-dBを得た。

M遺伝子を含むClaI断片をpHSG-dE-dBのClaI部位に挿入しpHSG-dE-dB-M-CCを構築した。pHSG-dE-dB-M-CCをEcoRIおよびBamHIで切断したものに、pHSG-dA-dM-EA-EBより切りだしたEcoRI-BamHI断片を挿入することによりpHSG-dE-dB-dM-CCを得た。

pHSG-dE-dB-dM-CCのClaI断片を、pUC18/T7(+)HVJRzのClaI部位に挿入したプラスミドpHVJ-dMEAを構築した。以上の構築スキームを図5に示した。

### [実施例3] M欠損型ベクターの作製

M遺伝子中の制限酵素部位、BsgI部位中に変異を持ち、M遺伝子の読み枠中に終止コドンが出現するように設計したオリゴヌクレオチドM-1(5'-ttaaggcctaaaccgatctcagaattacg-3') (配列番号: 3) およびM-2(5'-tatcattccctgtctcagcctgcc-3') (配列番号: 4) をPCR プライマーとして用い、pUC18/T7(+)HVJRzを錆型としてPCR反応を行った。PCR産物をpCR2.1にクローニングし、pCR-Mを得た (図6)

pCR-Mの塩基配列を確認後、pCR-MをStuIおよびXcmIの両制限酵素で処理した断

片をゲルから回収し、pHSG-M-CCをStuIおよびXcmIの両制限酵素で処理したものに挿入した。得られたプラスミドをpHSG-dM-CCと命名した。pHSG-dM-CCをClaIで切断して得られた断片を、pUC18/T7(+)HVJRzのClaI部位に挿入することにより、pHVJ-dMを得た。以上の構築スキームを図6に示した。

[実施例4] M欠失型およびM欠損型cDNAを用いた再構成試験

野生型(WT)、M欠失型(dMEA)、M欠損型(dM)の各cDNAからウイルス粒子を再構成するために以下の方法を用いた。

通常のトリプシン処理でシャーレからはがしたLLCMK2細胞（サル腎臓由来細胞株）を直径10cmのプラスチックシャーレに $2 \times 10^4$ 細胞播き、10%FBS(ギブコピーアールエル社)を含むMEM培地(ギブコピーアールエル社)中で、CO<sub>2</sub> 5%、37°Cの条件下で24時間培養した。シャーレから培地を取り除き、PBSで一度洗浄した後、MOI(Multiplicity of infection)が2となるように $8 \times 10^4$  pfu/mlにPBSにて希釈したT7ファージ由来RNAポリメラーゼを発現可能な組換えワクシニアウイルスペクター、vTF7-3(T.R.Fuerstら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8122-8126, 1986)の溶液を $500 \mu l$ 滴下し、15分ごとにウイルス液が全体にいきわたるようにシャーレを揺らしながら1時間感染させた。

一方、cDNA溶液を含む培地を以下のように作製した。まず、ポリスチレンチューブ中にFCS(牛胎児血清)を含まないOpti-MEM培地(ギブコピーアールエル社)500μlを入れ、その中にセンダイウイルスcDNAに由来するプラスミドpUC18/T7(+)HVJRz、pHVJ-dMEAおよびpHVJ-dMのうちいずれかひとつのプラスミド、pGEM-NP、pGEM-PおよびpGEM-Lの4種のプラスミドを、それぞれ20、5、2.5および5μgずつ加えた。さらに50μlのスーパーフェクト(SuperFect)(キアゲン社)を加え、室温に20分放置した。その中にOpti-MEM培地10mlを添加し、さらにRifampicinおよびCytosine arabinoside(Ara C)をそれぞれ終濃度 $100 \mu g/ml$ および $40 \mu g/ml$ となるように添加した。

1時間感染を行ったLLCMK2細胞を含む上記のシャーレからウイルス液を除去し

- 、上記cDNA溶液を含む培地をデカンテーションにより添加した後、CO<sub>2</sub> 5%、37°Cの条件下で48時間培養した。培地を除去せずに細胞をセルスクレーパーでかき取り
- 、培地および細胞を一緒にして15ml遠心管に移した。1200rpm、5分の遠心後、上清を除去し、沈殿している細胞を200μlのPBSに懸濁した。

#### [実施例5] 細胞懸濁液の発育鶏卵への接種とHAアッセイ

ウイルスが再構成されたか否かを評価するために、発育鶏卵を用いた検定を行なった。実施例4において得られた、200μlのPBSに懸濁した細胞を1x10<sup>4</sup>細胞/mlの溶液とし、これを順次PBSにて希釈し、1x10<sup>4</sup>、1x10<sup>3</sup>細胞/mlの細胞懸濁液を作製した。この懸濁液を100μlずつ発育鶏卵の10日卵に気室側より24Gの注射針を用いて接種した。

この鶏卵を35.5°Cの孵卵器内で3日間転卵しながら培養後、鶏卵の殻の気室の部分を切り取り、10mlのシリンジおよび18Gの注射針を用いて尿液を回収した。

回収した尿液をHAアッセイにより検定し、鶏卵内でウイルスが増殖したか否かの判定を行った。HAアッセイは以下のように行なった。

丸底の96穴プレートの2列目から12列目まで50μlのPBSを分注した。1列目にサンプルの尿液を100μl加えた。1列目のサンプル50μlを2列目のPBSに加え攪拌することにより、サンプルの2倍希釈液を作製した。この2倍希釈液50μlを3列目のPBSに加え攪拌することによりサンプルの4倍希釈液を作製した。同様の操作を繰り返すことにより二倍希釈系列を作製した。

すべての列に、PBSで希釈した50μlの1% 鶏保存血（コスマバイオ社）を加え、4°Cで1時間保温した。赤血球の凝集を肉眼で観察し、凝集したもののうち、最もウイルス希釈率の高いものの希釈率を、HA活性として表1に示した。

表 1

ウイルスDNA	HA活性
WT (野生型)	>16
dM (欠損型)	<2
dMEA2-1(欠失型)	<2
dMEA2-2(欠失型)	<2

ウイルスのcDNAとしては、野生型(pUC18/T7(+))HVJRz ; WT)、M欠損型(pHVJ-dM ; dM)、およびM欠失型(pHVJ-dMEA ; dMEA)を用いた。M欠失型については、2回の実験結果(dMEA2-1およびdMEA2-2)を示す。野生型は16以上の値を示したが、そのほかのサンプルについては活性が認められなかった。この結果は、M欠失型およびM欠損型cDNAを出発材料として用いた場合にはセンダイウイルスの通常の再構成試験においては伝播力のあるウイルスが生成されないことを示すものである。

#### [実施例 6] ブラーカー形成試験

CV-1細胞を、6穴プレート（コーニング社、マイクロプレート6well）に $5 \times 10^4$ 細胞ずつ播き、終夜培養した。

実施例4において最終的に得られたLLCMK2細胞を、 $1 \times 10^4$ 細胞/mlとなるようにPBSにて希釈して細胞懸濁液を作製し、1.5mlマイクロチューブ（エッペンドルフ社）に $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。分注した細胞懸濁液の一部は、-80°C、10分の凍結処理および室温の水で3分間インキュベートする融解処理による凍結融解操作を3回繰り返した。すべての細胞懸濁液に、終濃度 $0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにトリブシンを加え、37°C、30分保温した。

CV-1細胞を培養したプレートより、培地を取り除き、PBSで一回洗浄後、トリブシン処理をした上記の希釈細胞懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を重層し、15分ごとに液を行き渡ら

せながら1時間処理した。あらかじめ約45°Cに保温しておいた1%寒天を含む1xMEM, 0.1% BSA, Rifampicin 100 $\mu$ g/ml, Ara C 40 $\mu$ g/ml, Trypsin 0.75 $\mu$ g/mlを3ml重層し、寒天が固まった後、倒置した。CO<sub>2</sub> 5%, 37°Cの条件下で5日間培養した。

培養後、寒天の上から固定液（エタノール：酢酸=5:1）を1ml加え、90分室温に放置した。寒天を取り除き、200 $\mu$ lのアミドブラック溶液（0.5% Amido Black、エタノール：酢酸：水=45:10:45）を加え、直後に水洗し、細胞を染色することにより、ブラーク数の計測およびブラーク形状の評価を行なった。

この結果を以下の表2および図7に示した。

表2

## M欠失型およびM欠損型センダイウイルス再構成の効率

M遺伝子	ブラーク数	
	凍結し溶解したもの	凍結しないもの
	実験1	実験2
野生型	38	22
M欠損型(dM)	2	4
M欠失型(dMEA2-1)	27	26
M欠失型(dMEA2-2)	32	38
		14
		2
		60
		42

ウイルスのcDNAとしては、野生型(pUC18/T7(+)-HVJRz)、M欠損型(pHVJ-dM)、およびM欠失型(pHVJ-dMEA)を用いた。M欠失型については、2回の実験結果(dMEA2-1およびdMEA2-2)を示す。細胞懸濁液の凍結融解を行なったものと行わなかったものそれについてブラーク数を測定した。ブラークの数は、トランスフェクションしたLLCMK2細胞1×10<sup>6</sup>個における再構成されたウイルスの数を示している。凍結

融解を行ったものについては2回の実験を行った（実験1及び実験2）。センダイウイルスの再構成では、センダイウイルスゲノムに外来遺伝子を挿入した付加型ウイルスなどの変異ウイルスは再構成効率が下がることが報告されているが（M. Hasanら, J. Gen. Virol. 78:2813-2820, 1997）、M欠失型に関しては、野生型のそれとほぼ変わらない再構成効率を示した。M欠損型では、多少低い再構成効率を示した。また、トランسفエクション細胞を凍結融解したものとしないものでは、どちらもそのブラークの数に大きな違いは見られなかった。

表2および図7より明らかのように、M欠失型およびM欠損型cDNAに由来すると考えられるブラークが観察された。このブラークの大きさは、同時に行つた陽性対照（図7；WT1およびWT2）において形成した野生型のブラークに比べ明らかに小さいものであった。ブラークの形状をさらに詳細に検討するため、抗センダイウイルスポリクローナル抗体を用いてブラークの染色を行なった。なお、抗体は不活化精製センダイウイルスを抗原としてウサギに接種し、公知の方法で作製した。

実施例6に記載の、固定、アミドブラックでの染色後のブラークを、抗センダイウイルス抗体とハイブリダイズした後、FITC結合した抗ウサギIgG、または抗マウスIgG抗体とハイブリダイズした後、蛍光実体顕微鏡で観察した。その結果、野生型、M欠失型およびM欠損型のブラークでシグナルが検出され、センダイウイルスのブラークであることを確認した（図8）。

野生型cDNA由来のブラークは、ほぼ円形を保っているのに対して、欠失型、欠損型cDNA由来のブラークは、大きさが小さいだけでなく、円形ではなく変形していることが顕微鏡下で観察された（図8）。

#### 【実施例7】 抗体染色によるブラークの処理

大きさ、形状ともに野生型と異なるこれらのブラークが、M欠失型、M欠損型cDNAに由來したものかどうかを、M蛋白質の有無で確認した。すなわち、これらのブラークを、抗Mモノクローナル抗体で染色し蛍光を観察した。

蛍光抗体によるブラークの染色は、以下の方法によった。

アミドブラックでブラークを染色後、その位置を肉眼で観察し、マーカーペンでマーキングをした。ブラークを形成した6穴プレートを、各穴1mlのPBSで一回洗浄後、40倍に希釈した抗Mモノクローナル抗体を200μl重層し、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で45分間保温した。各穴を1mlのPBSで三回洗浄し、100倍に希釈したFITC結合抗マウスIgG抗体（コスマバイオ社）を200μl重層し、同様に45分間保温した。1mlのPBSで三回洗浄後、各穴1mlのPBSを重層し、蛍光実体顕微鏡下であらかじめマーキングしたブラークが染色されているかどうかを観察した。

観察後、一次抗体を抗センダイウイルスピリクローナル抗体、二次抗体をFITC結合抗ラビットIgG抗体（ICN Biomedicals社）に変え、同様の操作を行なった後、再び蛍光実体顕微鏡下で観察した。

野生型cDNA由来のブラークは、抗センダイウイルス抗体、抗Mモノクローナル抗体両方で染色されるのに対して、M欠失型、欠損型cDNA由来のブラークでは、抗センダイウイルス抗体では染色されるが、抗Mモノクローナル抗体では染色されなかった。すなわち、このブラークは完全なMタンパク質を発現していない、M欠失型、欠損型cDNA由来のブラークであることが示された。

以上の結果からM遺伝子を欠失または欠損したセンダイウイルス遺伝子に由来するブラークが得られた。また、このブラークを形成するウイルスは鶏卵中で増殖しないことから、細胞から出芽して上清にでることはなく、すなわち伝播力を有さないが、ブラークを形成することから、接触浸潤力を持つと考えられる。

このような増殖様式は、F、HN蛋白質を介した細胞融合に起因するものと考えられる。すなわち、センダイウイルスのコードする蛋白質のうち、F、HNは膜タンパクとして細胞表面に発現し、M蛋白質はその裏打ちとして細胞の内側からF、HNを支えて出芽がおこるが、M欠失型及びM欠損型の場合は、裏打ちがないために出芽がおこらない。しかし、F、HN蛋白質は細胞表面に発現しているため、この蛋白質を介して細胞融合がおこり、ウイルスゲノムは隣接した細胞に浸潤することが可

能となる。このようにして、出芽を伴わないウイルスの増殖が可能となると考えられる(図9)。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さないRNAウイルスペクターを提供するすることが可能となった。本発明のRNAウイルスペクターを利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、従来よりも効率的に遺伝子導入、細胞移植等を行うことが可能となった。

## 請求の範囲

1. 接触浸潤力及びRNA自律複製能に関わる遺伝子群を有するが、伝播力に関わる遺伝子群が欠失または不活性化された、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を形成するためのRNA。
2. エンベロープとウイルスコアとの両者と相互作用をする蛋白質をコードする遺伝子が欠失または不活性化されていることを特徴とする、請求項1記載のRNA。
3. エンベロープとウイルスコアとの両者と相互作用をする蛋白質がマトリックス蛋白質（M蛋白質）であることを特徴とする、請求項2記載のRNA。
4. RNAが非分節型（-）鎖RNAウイルス由来であることを特徴とする、請求項1記載のRNA。
5. RNAがセンダイウイルス由来で、M蛋白質をコードする遺伝子が欠失または不活性化されていることを特徴とする、請求項1記載のRNA。
6. 外来性遺伝子を含むことを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載のRN  
A。
7. 請求項1～6のいずれかに記載のRNAを含有する、該RNAを複製しつつ接触浸潤により該RNAを別の細胞に伝達することができる細胞。
8. 請求項1～6のいずれかに記載のRNAを、試験管内または細胞内で転写するこ  
とのできる錆型DNAを含むDNA。
9. 請求項1～6のいずれかに記載のRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを  
含む複合体で、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を  
有さない複合体。
10. a) 請求項1～6のいずれかに記載のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RN  
Aもしくは該cRNAを合成しうるユニット、及び  
b) 該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を合成しうる  
ユニット

を含むキット。

11. a)のユニットが請求項5または6に記載のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを合成しうるユニット、及び

b)のユニットがセンダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を合成しうるユニット

である、請求項10記載のキット。

12. 宿主内に、

a)請求項1～6のいずれかに記載のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを合成しうるユニット、及び

b)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を合成しうるユニット

を導入することを含む、請求項9に記載の複合体の製造方法。

13. a)のユニットが請求項5または6に記載のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを合成しうるユニット、及び

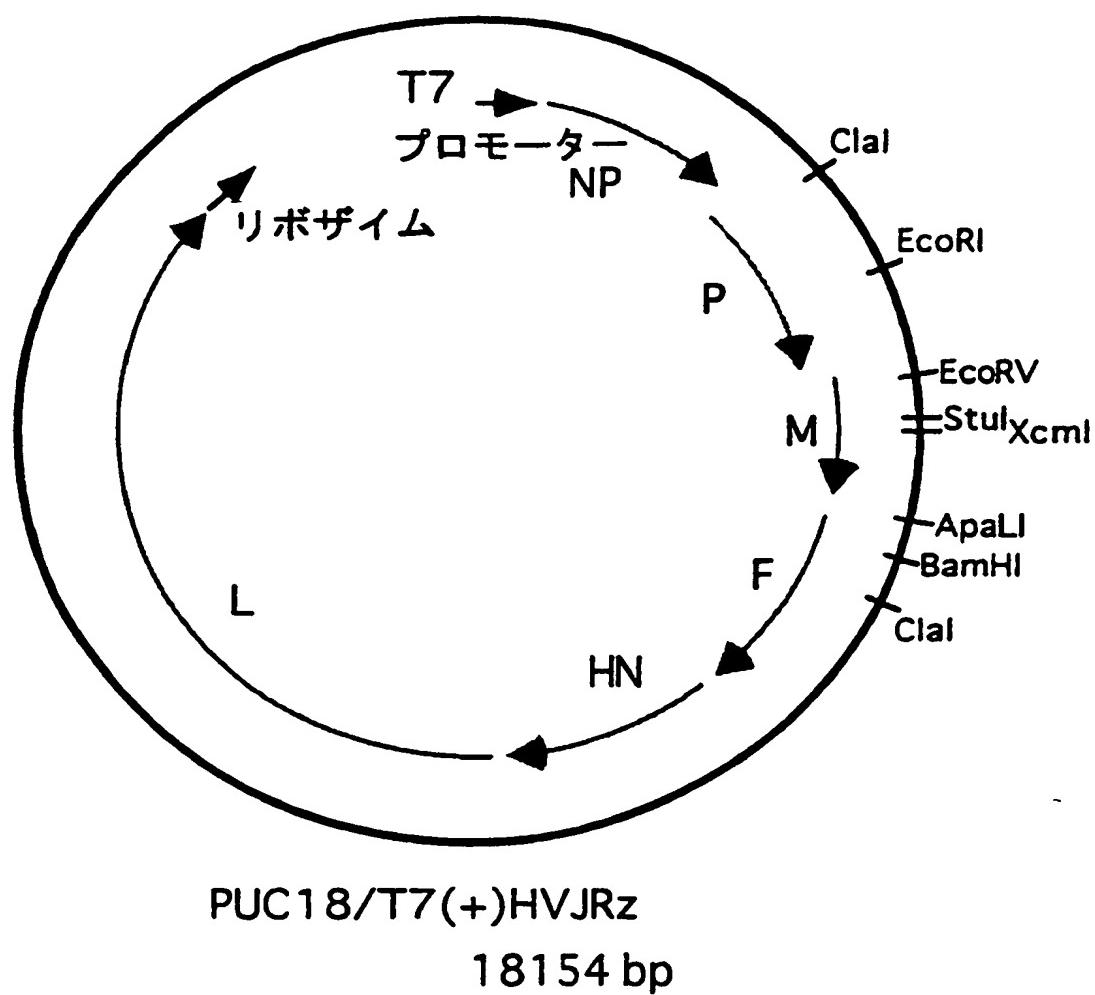
b)のユニットがセンダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を合成しうるユニット

である、請求項12記載の製造方法。

14. 請求項7に記載の細胞を非ヒト哺乳動物に接種し、該細胞が接触する細胞に外来遺伝子を発現させる方法。

1 / 9

図 1



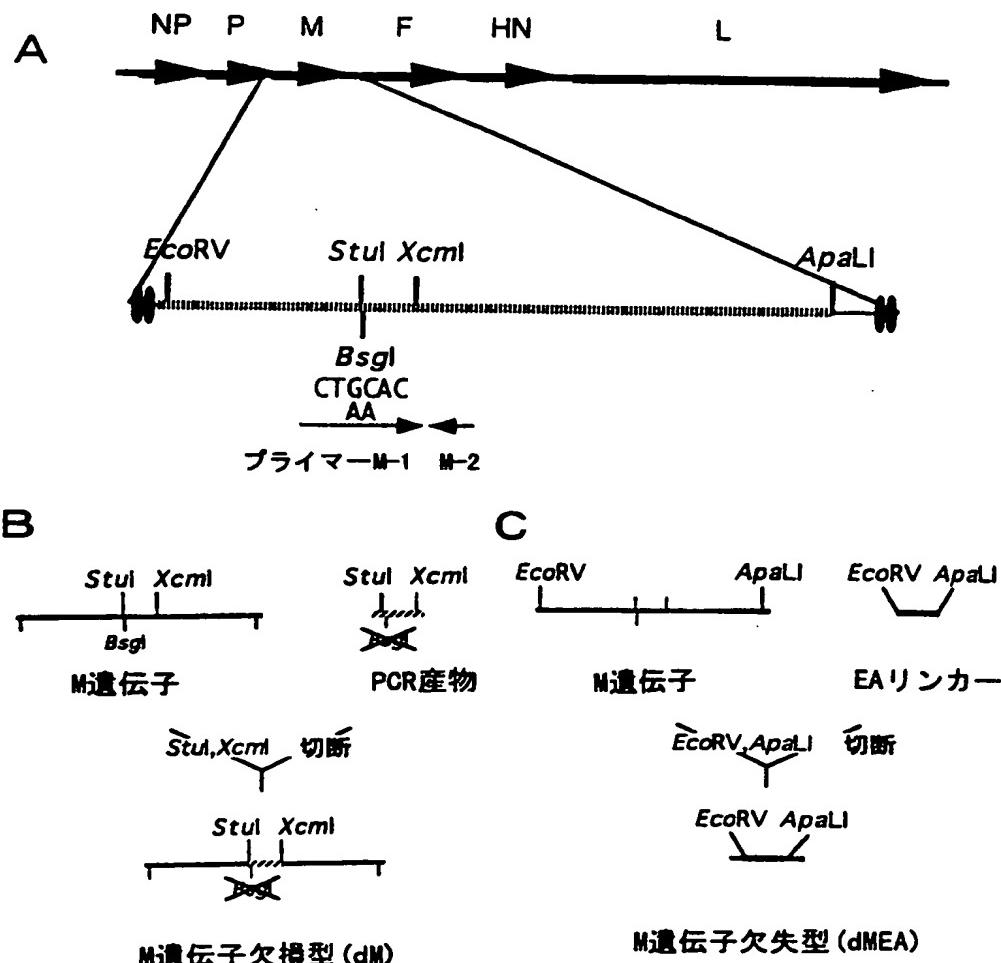
2 / 9

図 2

E	I	S		
TAAGAAAAAC	TTAGGGTGAA	AGAAATTCA	CCTAACACGG	CCGAATGGCA GATACTATA
GATTCCCTAA	GTTCTCATAT	GAGGATAACG	GTACTGTGGA	CCCCCTGCCT CTGAGAACTG
GTCCGGATAA	GAAAGCCATC	CCCCACATCA	GGATTGTCAA	GGTAGGAGTC CCTCCTAAC
ATGGAGTGAG	ATACCTAGAT	TTATTGCTCT	TGGGTTTCTT	TGAGACACCG AAACAAACAA
CCAATCTAGG	GAGCGTATCT	GACTTGACAG	AGCCGACCAG	CTACTCAATA TGCGGCTCCG
GGTCGTTACC	CATAGGTGTG	GCCAAATACT	ACGGGACTGA	TCAGGAACTC TTAAAGGCC
<u>BsaI</u>	<u>GCACCGATCT</u>	<u>CAGAATTACG</u>	<u>GTGAGGAGGA</u>	<u>CTGTTGAGC</u> AGGAGAGATG ATCGTATA
AA	XcmI			M-1 プライマー StuI
TGGTGGATTTC	GATTGGTGTCT	CCACTCCTAC	CATGCTCAGG	CAGGCTGAGA CAGGAAATGA
TATTAATGC	AAACAAGGTC	GCACTAGCTC	CCCAATGCCT	CCCTGTGGAC AAGGACATAA
GA	ACTCAGAGT	GGTGTGTC	AATGGGACAT	CTCTAGGGC AATCACCATA GCCAAGATCC
CAAAGACCT	TGCAGACCTT	GCATTGCCA	ACTCTATATC	CGTTAATTAA CTGGTGACAC
TCAAGACCGG	GATCTCCACA	GAACAAAAGG	GGGTACTCCC	AGTACTTGAT GATCAAGGGG
AGAAAAAGCT	CAATTTATG	GTGCACCTCG	GGTTGATCAG	GAGAAAGGTC GGGAAAGATA
ACTCTGTTGA	GTACTGCAAG	AGCAAGATTG	AGAGAATGCG	GCTGATTTTC TCACTTGGG
TAATCGGCCG	TATAAGCTTC	CATGTTCAAG	TTATTGGAC	ACTATCTAAG ACATTGATGA
GTCAAGCTCG	ATGGAAGAGG	GCAGTCTGCT	TCCCATTAAAT	GGATGTGAAT CCCCATATGA
ACATGGTGAT	TTGGGCGGCA	TCTGTAGAAA	TCACAGGCGT	CGATGCGGTG TTCCAACCGG
CCATCCCTCG	TGATTTCCGC	TACTACCTA	ATGTTGTGGC	TAAGAACATC GGAAGGATCA
<u>Apal</u>	<u>GAAAGCTGTA</u>	<u>AATGTGCAAC</u>	<u>CATCAGAGAC</u>	<u>CTGCGACAAT</u> GCCCCAAGCA GACACCACCT
			E	I S
GGCAGTCGGA	GCCACCGGGT	CACTCCTTGT	CTTAAATAAG	AAAAACTTAAAG GGATAAAAG
				1198

3 / 9

図 3

**D**

	<i>BsgI</i>	
WT塩基配列	CAG GAA CTC TTA AAG GCC TGC ACC GAT CTC	371
dM塩基配列	... ... ... ... ... ... ... AA ... ... ... ...	
WTアミノ酸配列	Gln Glu Leu Leu Lys Ala Cys Thr Asp Leu	110
dMアミノ酸配列	... ... ... ... ... ... ... Ter ... ... ...	

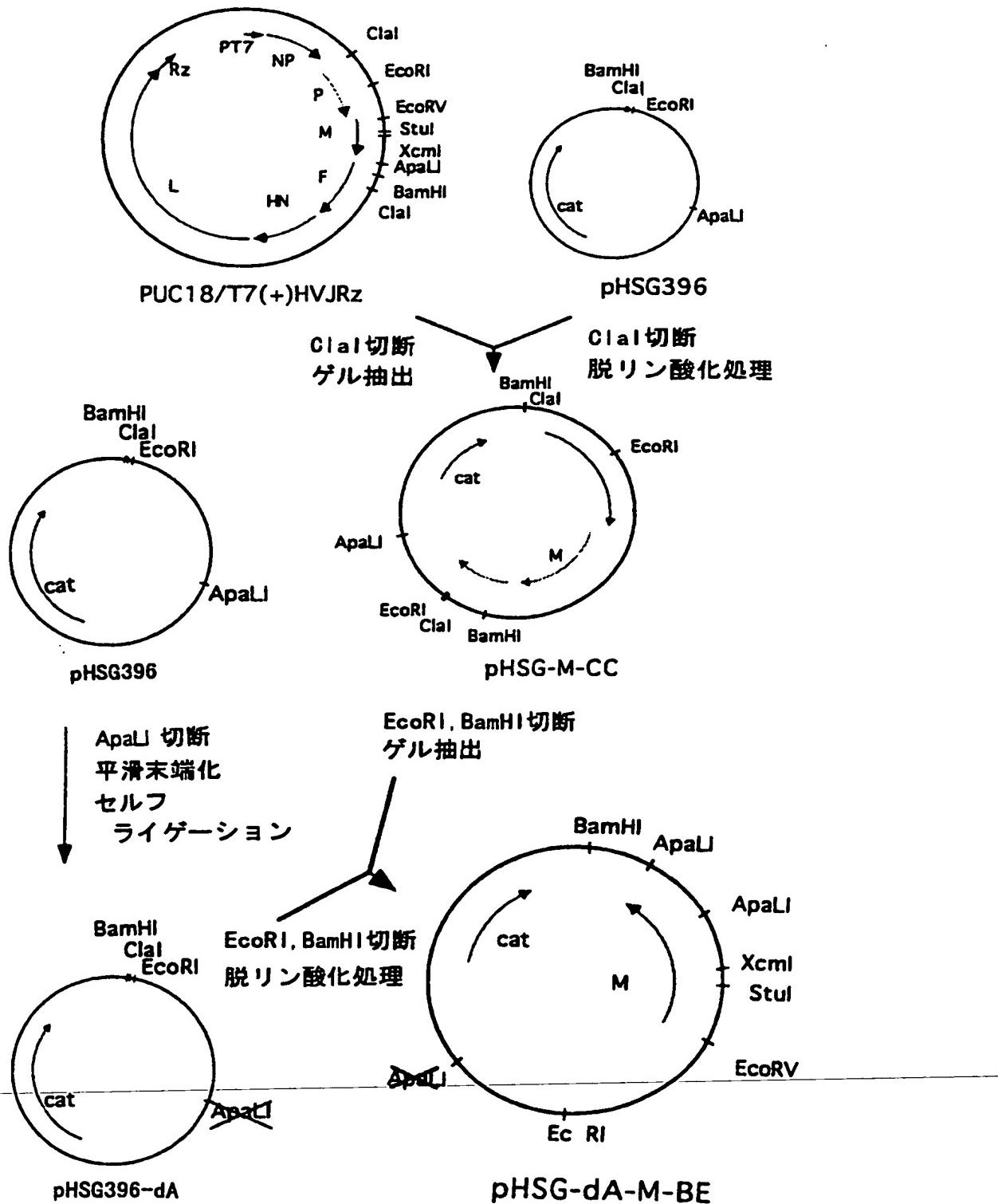
**E**

EA linker

<i>EcoRV</i>		<i>ApaLI</i>	
GGC	GAT ATC	TAT AGA TTC CCT AAG TTC TCA TAG TAG ATG TGC ACC	GGC A
CCG	CTA TAG	ATA TCT AAG GGA TTC AAG AGT ATC ATC TAC	ACG TGG CCG T

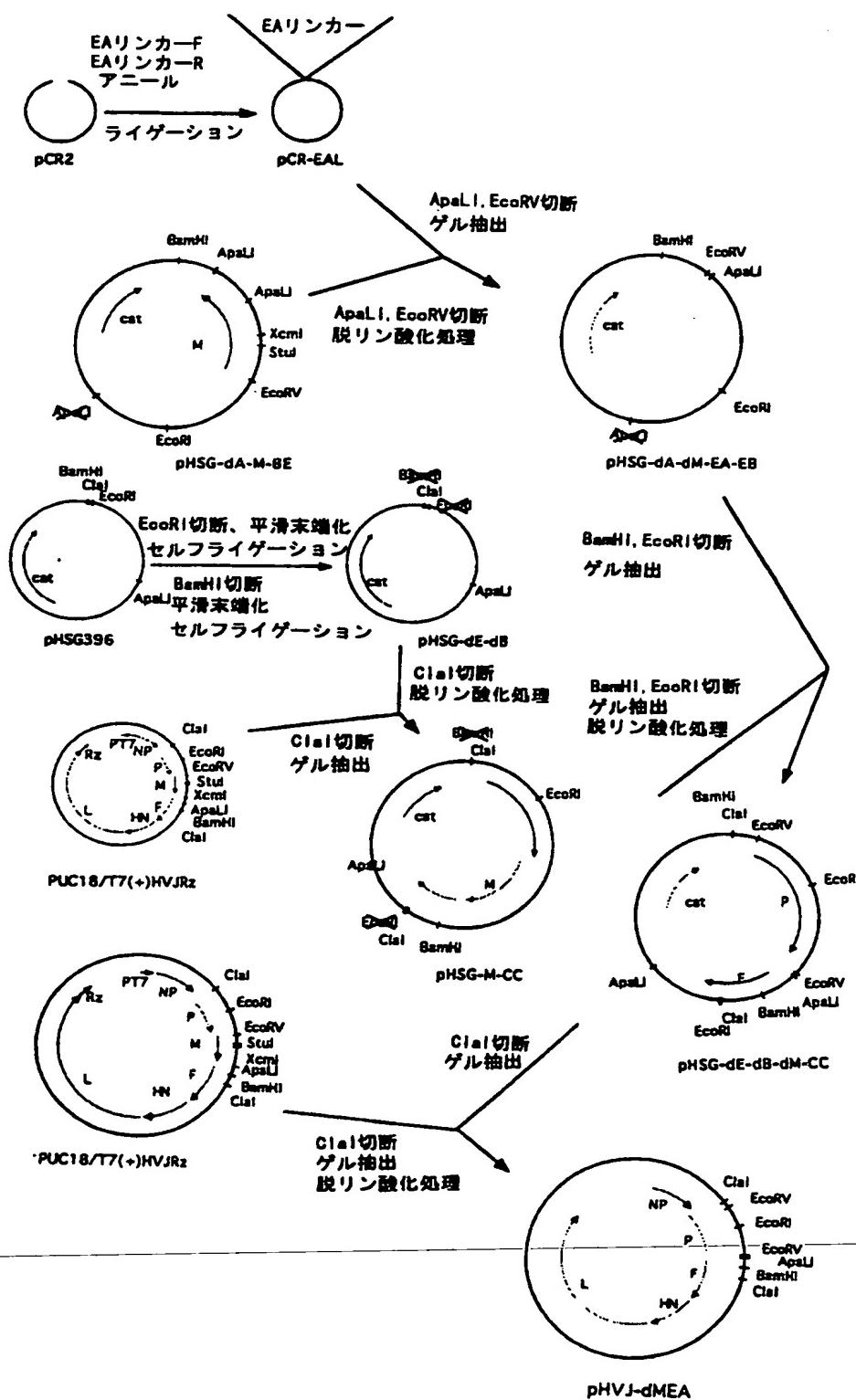
4 / 9

図 4



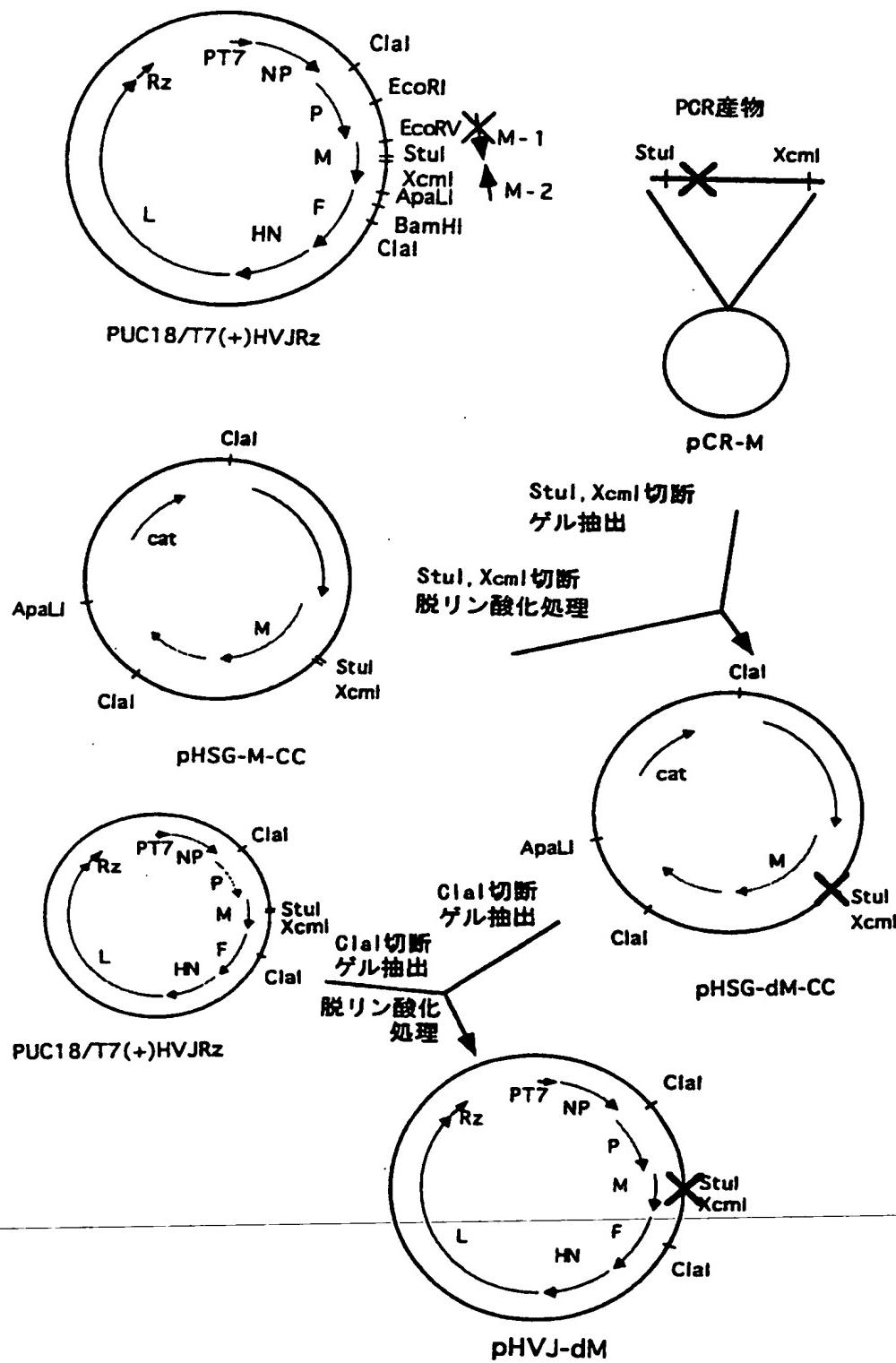
5 / 9

図 5



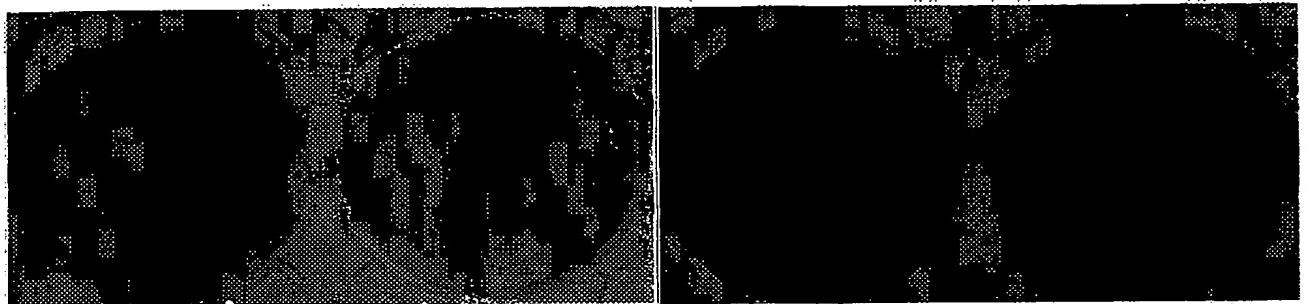
6 / 9

図 6



7 / 9

図 7

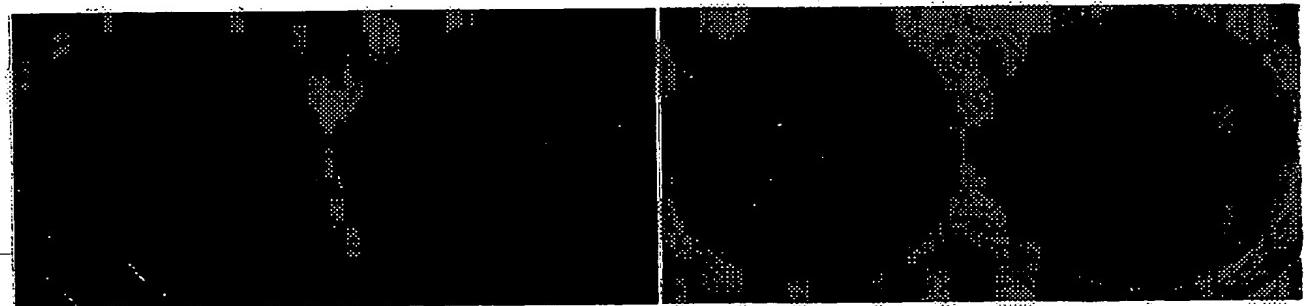


WT2

dMEA2-1



dMEA2-2



WT1

dM

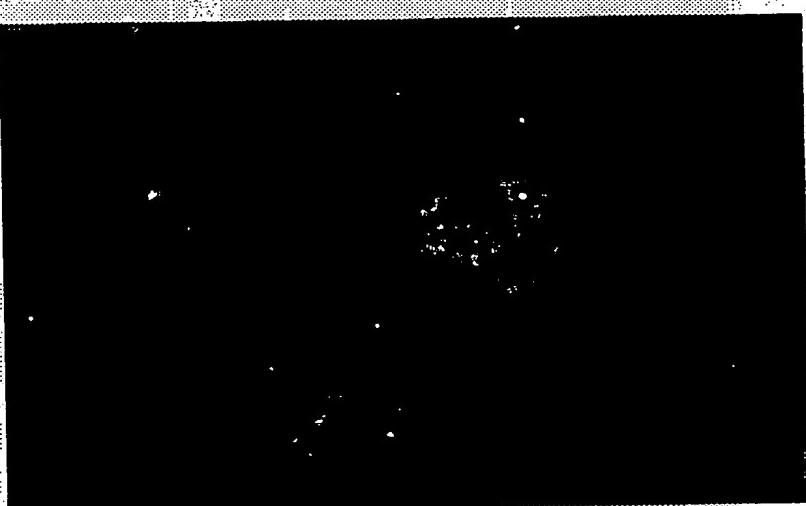
8 / 9

図 8

WT



dM

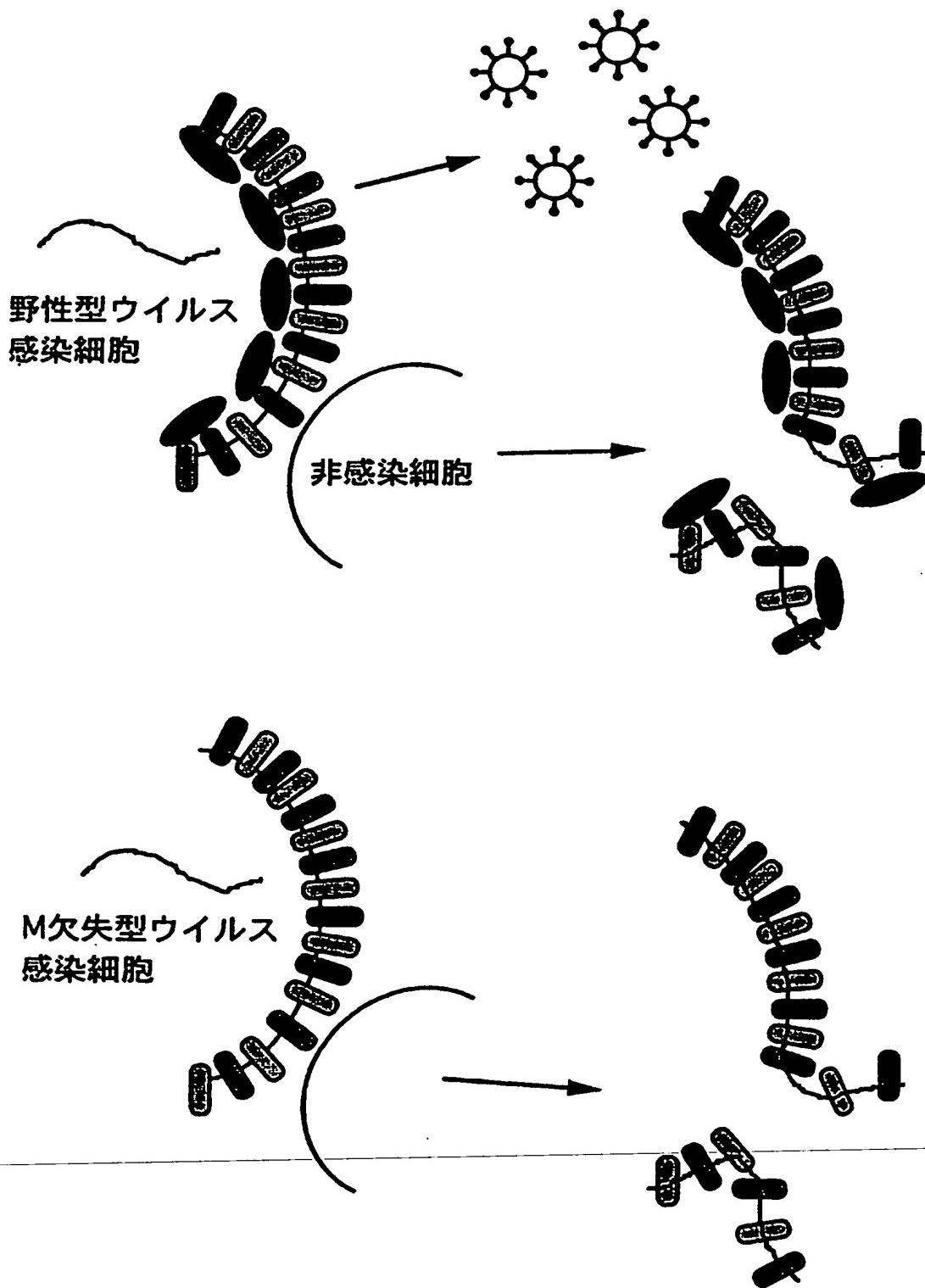


dMEA



9 / 9

図 9



配列表  
SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.  
株式会社ディナベック研究所

<120> RNA virus vector with contact-infiltration capability  
接触浸潤力を有するRNAウイルスベクター

<130> D3-002PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-227398

<151> 1998-08-11

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EcoRV-ApaL1  
linker

<400> 1

ggcgatatct atagattccc taagttctca tagtagatgt gcaccggca

49

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EcoRV-ApaL1  
linker

<400> 2

tgccggtgca catctactat gagaacttag ggaatctata gatatcgcc

49

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:A primer used  
for generating a stop codon within M gene of SeV

<400> 3

ttaaaggcct aaaccgatct cagaattacg

30

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:A primer used  
for generating a stop codon within M gene of SeV

<400> 4

tatcattccc tgtctcagcc tgcc

24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. <b>PCT/JP99/04333</b>
--

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Genevieve Mottet et al., "A Sendai Virus Vector Leading to the Efficient Expression of Mutant M Proteins Interfering with Virus Particle Budding" Virology (1996) Vol. 221 No. 1 P.159-171	1-14
X	WO, 97/16538, A1 (DNAVEC Research Inc.), 9 May, 1997 (09. 05. 97) & EP, 864645, A	1-14
A	Toru Kondou et al., "Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M Protein" The Journal Of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 29 P.21924-21930	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
**6 September, 1999 (06. 09. 99)**

Date of mailing of the international search report  
**21 September, 1999 (21. 09. 99)**

Name and mailing address of the ISA/  
**Japanese Patent Office**

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Genevieve Mottet et al. "A Sendai Virus Vector Leading to the Efficient Expression of Mutant M Proteins Interfering with Virus Particle Budding" Virology (1996) Vol. 221 No. 1 P. 159-171	1-14
X	W097/16538, A1 (株式会社ディナベック研究所) 09. 5月. 1997 (09. 05. 97) & EP, 864645, A	1-14
A	Toru Kondou et al. "Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M Protein" The Journal Of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 29 P. 21924-21930	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.09.99

国際調査報告の発送日

21.09.99

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N 9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## PENT COOPERATION TRE

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 April 2000 (10.04.00)	
International application No. PCT/JP99/04333	Applicant's or agent's file reference D3-002PCT
International filing date (day/month/year) 10 August 1999 (10.08.99)	Priority date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)
Applicant ASAKAWA, Makoto et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 February 2000 (18.02.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

## 特許協力条約

PCT

E P US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 D 3 - 0 0 2 PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04333	国際出願日 (日.月.年) 10.08.99	優先日 (日.月.年) 11.08.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  - この国際出願に含まれる書面による配列表
  - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は  出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、第 9 図とする。  出願人が示したとおりである。  なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>o</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>o</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) :

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Genevieve Mottet et al. "A Sendai Virus Vector Leading to the Efficient Expression of Mutant M Proteins Interfering with Virus Particle Budding" Virology (1996) Vol. 221 No. 1 P. 159-171	1-14
X	WO97/16538, A1 (株式会社ディナベック研究所) 09.5月.1997 (09.05.97) & EP, 864645, A	1-14
A	Toru Kondou et al. "Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M Protein" The Journal Of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 29 P. 21924-21930	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.09.99

国際調査報告の発送日

21.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

4 N 9162



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 D3-002 PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04333	国際出願日 (日.月.年) 10.08.99	優先日 (日.月.年) 11.08.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C12N 15/40, C12N 7/04, C12N 5/06, A61K 48/00		
出願人（氏名又は名称） 株式会社 ディナベック研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の單一性の欠如
- V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 01.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4.N 915-2

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-14 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-14 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-14 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-14 に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

## 特許協力条約

発信人 日本国特許庁(国際調査機関)

出願人代理人

PTO/PCT Rec'd 08 FEB 2001

清水 初志

あて名

殿

〒 300-0847

茨城県土浦市御町1-1-1  
関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

'99.9.22

受付

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書(法施行規則第41条)  
〔PCT規則44.1〕発送日  
(日.月.年)

21.09.99

出願人又は代理人  
の番類記号

D 3-002 PCT

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/04333

国際出願日  
(日.月.年)

10.08.99

出願人(氏名又は名称)

株式会社ディナベック研究所

1.  国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる(PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2.  国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項(PCT17条(2)(a))の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3.  法施行規則第44条(PCT規則40.2)に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続: 出願人は次の点に注意すること。

優先日から1ヶ月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から3ヶ月まで(官庁によってはもっと遅く)国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から1ヶ月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から1ヶ月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかつたすべての指定官庁に対しては優先日から2ヶ月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4 N 9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のためには補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができます。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正是国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることがある。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

## 様式PCT/ISA/220の備考（続き）

次に、添付する書簡中の、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合]：  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合]：  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合]：  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合]：  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

### “PCT19条(1)の規定に基づく説明書”（PCT規則46.4）

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる（明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない）。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

### 国際予審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書（及び説明書）を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予審査機関にも提出することが望ましい（PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照）。詳細は国際予審査請求書（PCT/IPEA/401）の注意書参照。

### 国内段階に移行するための国際出願の翻訳について

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁／選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁／選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

## 特許協力条約

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-002PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。			
国際出願番号 PCT/JP99/04333	国際出願日 (日.月.年)	10.08.99	優先日 (日.月.年)	11.08.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所				

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  - この国際出願に含まれる書面による配列表
  - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
- 2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
- 3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
- 4. 発明の名称は
  - 出願人が提出したものを承認する。
  - 次に示すように国際調査機関が作成した。

---

- 5. 要約は
  - 出願人が提出したものを承認する。
  - 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
- 6. 要約書とともに公表される図は、  
第 9 図とする。
  - 出願人が示したとおりである。
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。
  - なし

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/40, C12N7/04, C12N5/06, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Genevieve Mottet et al. "A Sendai Virus Vector Leading to the Efficient Expression of Mutant M Proteins Interfering with Virus Particle Budding" Virology (1996) Vol. 221 No. 1 P. 159-171	1-14
X	W097/16538, A1 (株式会社ディナベック研究所) 09.5月.1997 (09.05.97) & EP, 864645, A	1-14
A	Toru Kondou et al. "Temperature-sensitive Phenotype of a Mutant Sendai Virus Strain Is Caused by Its Insufficient Accumulation of the M Protein" The Journal Of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 29 P. 21924-21930	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.09.99

国際調査報告の発送日

21.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

4 N 9162

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 特許協力条約

発信人 日本国特許庁(国際予備審査機関)

出願人代理人

清水 初志

PTO/PCT Rec'd 08 FEB 2001 殿  
 あて名  
 〒 300-0847  
 茨城県土浦市御町1-1-1  
 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T

00.8.16

受付

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
[P C T規則71.1]発送日  
(日.月.年)

15.08.00

出願人又は代理人 の書類記号 D 3 - 0 0 2 P C T		重要な通知	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 4 3 3 3	国際出願日 (日.月.年) 10. 08. 99	優先日 (日.月.年) 11. 08. 98	
出願人(氏名又は名称) 株式会社 ディナベック研究所			
<p>1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。</p> <p>2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。</p> <p>3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告(付属書類を除く)の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。</p> <p>4. 注 意</p> <p>出願人は、各選択官庁に対し優先日から3ヶ月以内に(官庁によってはもっと遅く)所定の手続(翻訳文の提出及び国内手数料の支払い)をしなければならない(P C T 39条(1))(様式P C T / I B / 301とともに国際事務局から送付された注を参照)。</p> <p>国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。</p> <p>この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。</p> <p>選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、P C T出願人の手引き第II巻を参照すること。</p>			

名称及びあて名 日本国特許庁(I P E A / J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官	4 N	9 1 5 2
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 D3-002PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04333	国際出願日 (日.月.年) 10.08.99	優先日 (日.月.年) 11.08.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C12N 15/40, C12N 7/04, C12N 5/06, A61K 48/00		
出願人（氏名又は名称） 株式会社 ディナベック研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                  ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の単一性の欠如
- V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 01.08.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 富永 みどり 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

出願時の国際出願書類

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
出願時に提出されたもの  
PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-14

有

請求の範囲

無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-14

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-14

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-14 に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>D3-002PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/JP99/04333</b>	International filing date (day/month/year) <b>10 August 1999 (10.08.99)</b>	Priority date (day/month/year) <b>11 August 1998 (11.08.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N 15/40, 7/04, 5/06, A61K 48/00</b>		
Applicant <b>DNAVEC RESEARCH INC.</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>18 February 2000 (18.02.00)</b>	Date of completion of this report <b>01 August 2000 (01.08.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/JP99/04333

**I. Basis of the report****1. With regard to the elements of the international application:\***

- the international application as originally filed  
 the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

- the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

- the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

**2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:**

- the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).  
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:**

- contained in the international application in written form.  
 filed together with the international application in computer readable form.  
 furnished subsequently to this Authority in written form.  
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**4.  The amendments have resulted in the cancellation of:**

- the description, pages \_\_\_\_\_  
 the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

**5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\***

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/JP99/04333

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

The inventions described in claims 1 through 14 are not described in any of the documents cited in the ISR nor in any of the documents considered relevant to the inventions, nor are they obvious to a party skilled in the art.